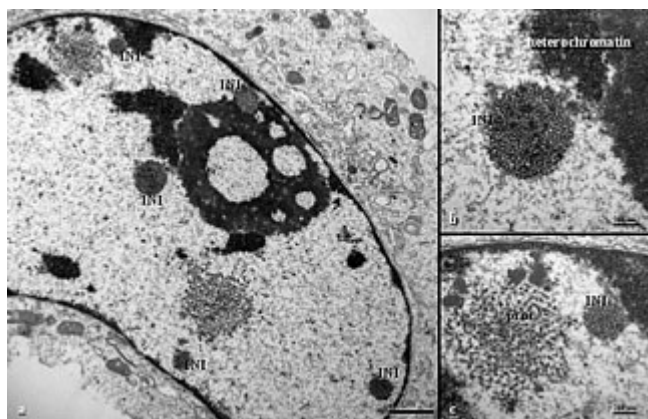


Circovirosi porcina, patogènesi i estudis ultraestructurals

09/2010 - Ciència Animal.

#El treball desenvolupat en aquesta tesi doctoral suposa un pas important en la lluita contra la circovirosi porcina. Aquesta malaltia, provocada essencialment pel circovirus porcí tipus 2 (PCV2), provoca el retardament en el creixement i la mort durant els primers mesos de vida del porc. Aquesta innovadora recerca consueix el primer estudi morfogènètic del PCV2 en cultius cel·lulars, aporta descripcions ultraestructurals dels teixits afectats i desvetlla la relació de la malaltia amb les mitocondries.



Cèl·lules limfoblastoides L35, 12h després d'inocular-se amb PCV2. (a) Al citoplasma cel·lular, alteracions a mitocondris i reticle endoplàsmic rugós. A més, es detectaren diversos INIs amb mida de 0.4-0.6 µm de diàmetre i cap membrana al voltant; (b) Detall: es destaca una INI amb partícules víriques (VLPs, de 19 nm de diàmetre i separades entre elles una distància de 12-15 nm) a prop d'heterocromatina; (c) Els INIs s'observen a prop de la membrana nuclear i de xarxes de proteïnes.

La síndrome multisistèmica d'aprimament post-deslletament o circovirosi porcina (CP) es una de las malalties mes importants que afecta al bestiar porcí a nivell mundial. La CP es caracteritza clínicament per un retard del creixement, pèrdua de pes, dificultat respiratòria, febre, diarrea i mort a les fases de transició i/o engreixi. L'agent etiològic essencial de la CP és el Circovirus porcí tipus 2 (PCV2), el virus més petit conegut a infectar mamíferos. Les característiques histopatològiques que defineixen la CP són la depleció limfocitària i infiltració histiocitària i/o de cèl·lules gegants multinucleades en els teixits limfoides; en alguns casos, s'acompanyen d'inclusions intranuclears i intracitoplàsmicsa macròfags. Ultraestructuralment, el PCV2 ha estat descrit com un virus sense embolcall, de 12 a 23 nm de diàmetre.

Diversos estudis han descrit diferents propietats biològiques del virus. Es coneix que l'adherència a la membrana cel·lular, així com la internalització del PCV2, es donen per endocitosi mediada per clatrina, i el cicle complet de replicació del virus dura al voltant de 24-36 hores. Un dels enfocaments més clàssics per a dilucidar el cicle viral en diferents tipus cel·lulars inclou estudis de microscopia electrònica. No obstant, a l'inici d'aquesta tesi, es disposava de poc coneixement sobre la localització subcel·lular de PCV2 en cèl·lules infectades in vitro, així com als teixits de porcs naturalment afectats per CP. En raó d'això, l'objectiu principal del present treball doctoral va ser estudiar les alteracions ultraestructurals associades a la infecció per PCV2 i determinar la localització del virus a nivell subcel·lular, descrivint la morfogènesi de PCV2 en els cultius cel·lulars i avaluar les troballes ultraestructurals relacionades amb partícules consistents amb PCV2 (VLPs) en els limfonodes provinents de porcs afectats amb CP.

En el primer estudi de la tesi (Capítol 3) es va descriure la morfogènesi completa de PCV2 en un clon de la línia de cèl·lules limfoblastoides L35 (cèl·lules L35), a través de tècniques de microscopia electrònica. Les cèl·lules van ser infectades amb PCV2, amb una multiplicitat d'infecció de 10, i van ser avaluades a diferents temps postinfecció (0, 6, 12, 24, 48, 60 i 72 hores postinfecció, hpi). Després de la internalització del virus per endocitosi, es va descriure una primera fase citoplasmàtica, en la qual les partícules de PCV2 formaven inicialment agregats o cossos d'inclusions intracitoplasmàtics (ICIs). Posteriorment, PCV2 es va mostrar estretament relacionat amb les mitocondries. Subsegüentment, es van observar factories virals (VFs) al nucli. La membrana nuclear aparentment participa en l'ensamblatge i l'encapsidació viral. Els virions immadurs surten del nucli, i en una segona fase citoplasmàtica es formen noves ICIs. Els canvis de les organel·les associats a la infecció per PCV2 van ser estudiats mitjançant immunomarcatge amb or col·loidal. El marcatge amb or col·loidal va ser observat en les ICIs, no sent així a les inclusions intranuclears (INIs). Els resultats obtinguts suggereixen que, al final del cicle de replicació viral (entre 24 i 48 hpi), el PCV2 és alliberat de la cèl·lula per dues vies diferents: per gemmació de grups virals o per lisi de cèl·lules apoptòtiques/mortes.

Per a desenvolupar el segon i el tercer estudis (Capítols 4 i 5 de la tesi) es van prendre mostres de limfonodes procedents d'animals amb CP i animals sans (control). Només es van observar canvis significatius en histiòcits que es trobaven infiltrant els teixits limfoides d'animals amb CP. Els canvis ultraestructurals més significatius foren proliferació i tumefacció de mitocondries,

proliferació i dilatació del reticle endoplàsmic rugós i aparell de Golgi. Un nombre significatiu de ICIs van ser observades properes a aquestes organel·les que es mostraven marcadament alterades. Les ICIs es van classificar com petites o grans, estaven delimitades per una doble membrana, i van mostrar un aspecte granular o contenint xarxes paracristal·lines de VLPs. Un nombre escàs de histiòcits també van mostrar INIs, sense membrana al voltant. Les VLPs amb forma icosaèdrica tenien entre 8 i 17 nm de diàmetre i van ser marcades amb un anticòs monoclonal anti-PCV2. Les VFs sovint es trobaven adjacents a mitocondries marcadament tumefactes, les quals eren positives al immunomarcatge amb or col·loidal. Com s'esperava, la depleció limfoide va ser una troballa remarcable dels limfonodes procedents de porcs afectats amb CP. L'estudi de colocalització mitjançant microscopia confocal i microscopia electrònica va indicar la relació entre les VFs i les mitocondries, suggerint que aquestes organel·les poguessin tenir un paper en la replicació de PCV2. Les presents troballes constitueixen un suport addicional a la hipòtesi que el virus es replica als histiòcits dels limfonodes.

En resum, la present tesi inclou el primer estudi de morfogènesi de PCV2 en cultius cel·lulars, així com descripcions ultraestructurals detallades de limfonodes procedents de porcs amb CP. Els resultats obtinguts permeten complementar els treballs existents sobre el cicle de replicació del PCV2 en cultius cel·lulars i obtenir nous coneixements en la patogènia de la CP. Una de les majors contribucions de la present tesi és la descripció de l'íntima associació entre PCV2 i les mitocondries.

Carolina Rodríguez Cariño

Centre de Recerca en Sanitat Animal

"Ultrastructural studies on Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection". Tesi doctoral defensada per Carolina Rodríguez Cariño, el 13 de juliol de 2010. Director: Dr. Joaquim Segalés i Coma.